人工抗原合成研究进展

李容庆，权春善*，张丽影*，刘佳璐，张祥，尚菲

（大连民族大学生命科学学院，生物技术与资源利用教育部重点实验室，辽宁大连 116600）

摘要：近年来，以小分子化合物为半抗原的免疫分析技术在食品药品、环境保护等领域已有诸多应用，并取得了较为理想的检测效果。小分子化合物只能与载体偶联形成人工抗原后，方能借助 T 细胞表位间接诱导 B 细胞进行增殖与分化，进而产生特异性抗体。高效的人工抗原的合成是保证免疫分析的前提和关键，本文就近年来国内外有关人工抗原合成过程中所涉及的小分子半抗原的设计与合成方法、载体的选择、半抗原与载体的偶联方法、人工抗原的纯化及鉴定方法等进行综述。

关键词：半抗原；人工抗原；载体的选择；抗原纯化；抗原鉴定

中图分类号：

Progress in the synthesis of artificial antigen

LI Rong-qing, Quan CHUN-shan*, ZHANG Li-ying*, LIU Jialu, ZHANG Xiang, SHANG Fei

(Key Laboratory of the State Ethnic Affairs Commission-Ministry of Education，School of Life Science，Dalian Nationalities University，Dalian 116600，China)

Abstract: The immunoassay with small molecular as a hapten has been used in many fields, such as food and drug, environmental protection and so on. It has obtained more ideal detection results. The small molecular must be coupled with the carrier to form an artificial antigen, which can indirectly induce the proliferation and differentiation of B cells by using the epitopes of T cells, and then produce specific antibodies. The synthesis of high efficient artificial antigen is the precondition and key to ensure immune analysis. Based on this, the design and synthesis methods, the selection of the carrier, the coupling method of the hapten and the carrier, the purification and identification methods of the artificial antigen, both here and abroad, are reviewed in this paper.

Key Words: hapten; artificial antigen; selection of carrier; purification of antigen; identification of antigen

1. 引 言

* 第一作者，李容庆，Tel：0411-87656219, E-mail：1446877523@qq.com. 硕士研究生.

通讯联系人，权春善，Tel: 0411-87656219, E-mail：mikyeken@dlnu.edu.cn，博士，教授，主要研究方向为化学生物学。

张丽影，Tel: 0411-87656215, E-mail：zhangly@dlnu.edu.cn，博士，副教授，主要研究方向为化学生物学。

基金项目：国家自然科学基金（21272031, 21372037）中央高校自主科研基金（wd01190, DCPY2016052，DCPY2018027）。

免疫分析技术（IA）是以抗原和抗体之间的特异性识别、可逆性结合为原理的分析技术。因其具有特异性强、灵敏度高、操作相对简单、检测速度快、成本低廉等诸多优点而备受瞩目。此项技术不仅在细菌、核酸、蛋白质等大分子化合物的检测方面应用广泛，在检测相对分子质量小于 1000 的小分子化合物方面，也发挥着极为重要的作用。近年来，在食品安全 [1-3]、抗生素残留[4, 5]、环境污染[6-7]、毒品检测[8]、医药研发[9-11]等诸多领域，以检测小分子化合物为目的的免疫分析技术层出不穷。

与蛋白、核酸等大分子化合物不同，小分子化合物具有反应原性而无免疫原性，即缺乏 T 细胞表位而无法直接诱导机体产生相应的特异性抗体。因此，小分子化合物只能被称为半抗原（不完全抗原），需根据免疫学原理将其与载体大分子偶联后形成人工抗原，从而获得免疫原性，人工抗原再借助 T 细胞表位间接诱导 B 细胞进行增殖与分化，进而产生特异性抗体。

高效的人工抗原的合成是保证免疫分析的前提和关键。如何针对待检测物质设计小分子半抗原、如何选择载体、如何将小分子半抗原与载体偶联，以及如何进行人工抗原的分离纯化等诸多因素影响着人工抗原的产量及质量，进而影响到抗体对待测小分子物质的特异性免疫能力。基于此，本文就近年来国内外人工抗原合成过程中所涉及的半抗原的设计与合成、载体的选择、半抗原与载体的偶联、人工抗原的纯化等进行了综述，以期为相关研究提供理论及实验参考。

2. 半抗原的设计与合成

2.1 半抗原的设计原则

许多待检测的小分子由于稳定性等问题，无法直接作为半抗原，因此，需利用其结构类似物作为半抗原。这就要求，半抗原的设计应尽可能与原待测小分子相似（分子结构、特征基团、立体化学、电子分布、电子云密度和疏水性），从而保证获得的抗体能够与原待测小分子发生特异性免疫反应。例如，天然的磷酸化组氨酸存在着两种形式，即π-磷酸化组氨酸（π-pHis）和τ-磷酸化组氨酸（τ-pHis），两种分子中的磷酸基团均连接在组氨酸咪唑环的氮原子上，形成的 N-P 健在酸性条件下极不稳定（图 1）。因此，无法直接以其作为半抗原制备组氨酸磷酸化蛋白的特异性抗体，只能寻找与它们结构相似的小分子。Muir [12, 13]以三唑环和吡唑环替代τ-pHis 中的咪唑环，以性质稳定的 C-P 键替代磷酸化组氨酸中的 N-P 键，得到了两类磷酸化组氨酸结构类似物 pTze 和 pPye，以其作为半抗原制备的抗体对组氨酸磷酸化蛋白均表现出良好的识别能力。因 pPye 的环结构更接近τ-pHis，它的抗体较 pTze 抗体识别能力更为优异。

π-pHis τ-pHis pTze pPye

图 1 磷酸化组氨酸及其结构类似物半抗原

Fig.1 phosphohistidine structural analogues used as hapten

由于抗原的免疫原性与半抗原分子空间结构的复杂程度呈正相关，引入不饱和的立体结构（苯环、杂环和支链等基团），增加半抗原结构的复杂性，突出抗原决定簇，能显著增强抗原的免疫原性，产生高效价的抗体，但其特异性将会受到影响。Kim 等[14]在研究半抗原异质体对有机磷杀虫剂倍硫磷的免疫分析灵敏度和酶联免疫吸附实验时发现，半抗原分子支链上含有 5 个亚甲基时产生的抗体比三个亚甲基产生的灵敏度高 3.5 倍（表 1）。Goodrow 等[15]认为，如半抗原分子具有苯环结构，则制备抗体的成功率可达到 30%，而不含苯环结构制备抗体的成功率仅为 9%。

表 1 不同结构半抗原对抗体 ELISA 灵敏度的影响

Table 2　Inffuence of hapten structures on the antibody ELISA sensitivity

Antiserum Dilution	Coating antigen hapten (ng/well)	IC_{50} (ng/ml)
1:10000	Me, MeO, S, P–O, SMe, $HO_2C(H_2C)_3HN$	10000
1:10000	Me, MeO, S, P–O, SMe, $HO_2C(H_2C)_5HN$	2840

2.2 半抗原连接臂的选择

半抗原的特征结构和载体蛋白之间的连接需要一定的媒介，即连接臂。连接臂多为碳链，以确保半抗原小分子能充分暴露在人工抗原的表面，最大限度地被免疫机体识别。如果半抗原小分子结构中具有活性基团，如氨基、巯基、羧基、羟基等，其可直接与载体蛋白偶联；若没有上述活性基团，则需要根据免疫学理论并结合原待测小分子自身结构特点进行设计，即在连接臂末端引入相应的活性基团，但要确保连接臂不诱导机体产生 “臂抗体”。

半抗原连接臂的选择一般应遵循以下原则：

1. 连接臂与半抗原小分子连接的位置应尽量远离半抗原小分子的特征官能团，最大限度的使特征部位裸露在外，以避免对特异性抗原决定簇的干扰，提高抗体的亲和性和特异性，提高抗体与目标半抗原的识别能力。研究表明，当半抗原在不同的连接位点与连接臂连接，

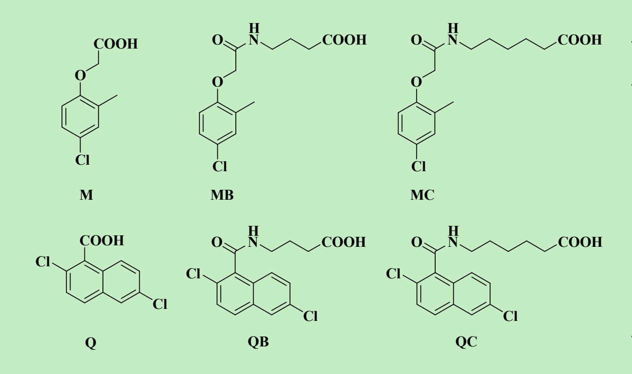
修饰后形成的半抗原的空间结构和电子分布等均不同，导致最终产生的抗体的特异性、亲和力和效价值不同。原因主要有以下两个方面：一方面，连接位点与半抗原的特征结构距离过近，则结果与连接臂过短产生的影响相同，即半抗原分子的特征结构不能充分暴露在人工抗原的表面，从而影响机体的免疫系统对半抗原的识别；另一方面，连接位点不同，连接臂的电子分布对半抗原的电子分布产生不同影响，半抗原的电化学性质发生变化，从而影响机体免疫系统对半抗原的识别，导致抗体的特性发生变化。因此，在选择连接位点时，即要充分考虑半抗原分子特征结构的裸露，也要注意连接臂的电子分布对半抗原的影响。

贾敏[16]在设计雌酚类半抗原时即充分考虑了连接臂的引入位点：雌酚类半抗原有三种结构，分别是己烯雌酚（DES）、己烷雌酚（HEX）和双烯雌酚（DIS）（图 2）。引入连接臂时，可从烃基部位引入或从酚羟基部位。但如在烃基部位引入连接臂，对于 DES、DIS 而言，其特异性的双键结构被破坏，导致制备的抗体特异性弱；对于 HEX 而言，其烃基部位不易活化，连接臂引入较为困难。如从酚羟基部位引入连接臂，对于 DES、HEX 和 DIS 而言均易制备，且保留半抗原的特异性结构，因此制备的抗体具有较强的特异性。

图 2 雌酚类半抗原

Fig.2 Stilbestrol hapten

2. 连接臂长度应适宜，目前部分学者认为连接臂的最佳长度为 3~6 个原子[17]。连接臂过短，则载体的空间位阻会对半抗原特征结构产生影响，使半抗原分子的特征结构不能充分暴露在人工抗原的表面，从而影响机体免疫系统对半抗原的识别。连接臂过长，则连接臂会受到自身或者外界影响发生“折叠”，半抗原不能充分展开，导致半抗原分子的特征结构部分被载体蛋白掩盖，半抗原不被机体的免疫系统识别。李静宇等[5]对呋喃唑酮代谢物人工抗原的合成进行研究时发现，引入 6 个原子碳链的连接臂比引入 1 个原子碳链的连接臂效果更好，免疫机体对抗原识别能力高，特异性强。施海燕[18]等研究 2-甲基-4-氯苯氧基乙酸（M）和二氯喹啉酸（Q）人工抗原合成时，分别以含有 0、4、6 个碳原子连接臂的半抗原与 BSA 偶联，也得到了相同的结论。此外她们还发现，半抗原主体结构相同时，连接臂的增长会显著增加半抗原与载体蛋白的的偶联率；连接臂长度相同时半抗原主体结构也会影响偶联率（图 3）。



人工抗原	偶联比	人工抗原	偶联比
M-BSA	4:1	Q-BSA	1:1
M-OVA	2:1	Q-OVA	1:1
MB-BSA	25:1	QB-BSA	4:1
MB-OVA	14:1	QB-OVA	2:1
MC-BSA	30:1	QC-BSA	9:1
MC-OVA	17:1	QC-OVA	4:1

图 3 连接臂长度对人工抗原偶联率的影响

Fig.3 Effect of the linking spacer length on the coupling ratio of artificial antigen

Kim[19, 20]等在研究连接臂长度对抗体的影响时发现。当其他条件一致时，连接臂的长度在 2-6 之间，不同免疫原产生的抗体在亲和能力、特异性、灵敏度方面都没有明显的差异。赖丹[21]等在研究邻苯二甲酸酯塑化剂人工抗原的合成时，用零连接臂的半抗原与 BSA 偶联也得到了特异性较好的抗体。

3. 连接臂的引入通常以末端含活性基团（如氨基、巯基、羧基、羟基、硝基、羰基等）的链烃为最佳，尽量避免引入含共轭双键或杂环的连接臂，最大程度减少抗体对连接臂的识别，提高对半抗原的识别。王倩等[22]在研究去甲替林人工抗原的制备时，其半抗原连接臂中含有烃基支链、叔氨基和羰基（图 3a）。李丽华[23]等在研究 3-氨基-2-噁唑烷酮半抗原的合成时，在半抗原连接臂中引入苯环和酚羟基，结果显示制备抗体的特异性显著增加（图 3b）。

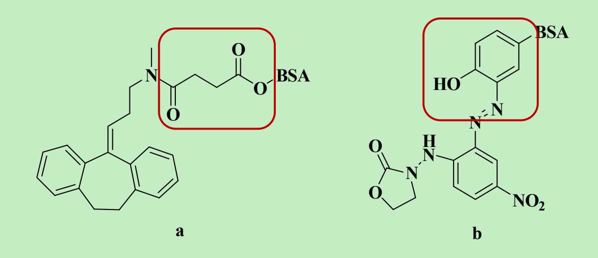


图 4　a:去甲替林半抗原；　b:3-氨基-2-噁唑烷酮半抗原

Fig. 4 a. Norepinephrine hapten; b: 3-Amino-2-oxazolidinone hapten

4. 连接臂的引入应确保其与母体成键的稳定性，即制备过程中不易断裂，免疫过程中在动物体内稳定。此外，还应考虑反应条件应较为温和，产物易分离纯化，产率高及成本因素，以便量产。

以上原则和实例表明，对连接臂长度的确定目前依然没有定论，对于不同的母体结构，确定最适连接臂长度和末端活性基团，往往需要进行正交实验才能得到准确的结论。

2.3 半抗原的制备、纯化与鉴定

半抗原制备是指通过化学方法对无连接臂或者需要基团保护的半抗原小分子进行适当修饰。目前报道的半抗原制备主要是在半抗原小分子的连接位点进行基团转化，进而引入连接

臂。常用的化学修饰法有:（1）氧化法：如羟基氧化成醛基；（2）还原法：如硝基还原成氨基；（3）水解法：如叔氨基水解成氨基、酯基水解成羧基等；（4）加成法：如双键加成；（5）取代法：如卤素原子被取代等。

表 2 常用小分子半抗原的制备方法及原理

Table 2 Preparation methods and principles of commonly used small molecular haptens

反应类型	反应原理	实例
氧化法	$NaIO_4$	[24]
还原法	Fe, HCl/HOAc	[25]
水解法	$NH_2NH_2\ H_2O$	[5]
加成法	Br_2	[26]
取代法	Br～COOEt	[7]

张萌等[26]研究四溴双酚 A 类化合物半抗原的合成时同时采用了取代法、加成法和水解法，具体合成路线如图 5 所示：

Br_2/CH_3COOH → NaOH/EtOH/H_2O →

图 5 半抗原 TBBPA-D2 的合成路线

Fig. 5 Synthetic route of hapten TBBPA-D2

目前报道较多的，对半抗原进行分离纯化的方法包括：TLC 法、柱层析法、萃取法等。TLC 法虽能得到较纯的产物，但其制备量少所以应用较少。柱层析法和萃取法因操作简单、耗材少且溶剂可回收利用而应用较为广泛。

常用的半抗原鉴定方法有红外光谱法，紫外光谱法、ESI-MS 法、核磁共振法、元素分析法、HPLC-MS 法等，质谱法与核磁共振法结合运用可快速鉴定半抗原的结构和分子量。

3．半抗原与载体的偶联

3.1 载体的作用

在人工抗原合成的过程中，载体起着至关重要的作用。由于半抗原自身分子量小，无法诱导免疫应答，因此需要依靠载体的特异性和免疫原性，诱导机体产生免疫应答反应，从而诱导对半抗原的识别。选择载体时应对以下几个因素进行综合考虑：1、载体要有充足的活性基团与半抗原偶联；2、载体要有弱免疫原性；3、载体要有良好的溶解性；4、载体对机体无毒；5、载体相对廉价易得。

3.2 载体的种类

目前常用的载体主要有三大类：蛋白、多聚肽和大分子化合物。蛋白类载体中最为常用的是牛血清蛋白（BSA）、鸡卵清蛋白（OVA）、和钥孔血蓝蛋白（KLH）。其中，BSA 运用得最多，连接技术也最成熟，这是因为它不仅理化性质稳定、不易变性、免疫活性好、价廉易得，而且自由氨基多，在不同的 pH、离子强度以及有机溶剂下均有良好的溶解度。KLH 虽免疫活性最好，但是其价格昂贵，所以运用得较少。近年来，也相继出现了与牛γ球蛋白（BGG）[8]、兔血清蛋白（RSA）[27]、甲状腺球蛋白（Thyroglobulin）[28]、猪血清白蛋白（PSA）[29] 和鲎血蓝蛋白(LPH)[30]等进行连接的新尝试。除蛋白类在体外，研究者也尝试利用人工合成的多聚肽，如多聚赖氨酸（PLL）[3]代替载体蛋白与小分子半抗原连接。与蛋白类载体相比，多聚肽中游离的氨基密度更大，偶联条件温和，偶联率高，且多聚肽自身的免疫原性低，最终获得的抗体中抗载体的部分较少，抗半抗原的部分较多，对半抗原的识别能力高。此外，也有人报道用大分子聚合物代替载体蛋白，如羧甲基纤维素、聚乙烯比咯烷酮[31]。但目前大多数研究工作仍然使用蛋白作为载体，多聚肽和大分子聚合物应用较少。

3.3 半抗原与载体的偶联原理及方法

合成人工抗原的基本原则主要包括，偶联后的产物偶联率均一、稳定；易于纯化分离；偶联条件温和；最重要的是产物的结构要尽量减小对抗原特征基团的影响。目前报道半抗原与载体的偶联方法有化学偶联法、化学生物学法和免疫学标记法。其中化学偶联法最为常用，其具体的方法及原理见表 3。

表 3 常用小分子半抗原与载体蛋白化学偶联的方法及原理

Table 3 Chemical coupling methods and principles of small molecule hapten with carrier protein

活性基团	偶联方法	反应原理	实例
	高碘酸钠反应法	R–CH₂–CH(OH)–CH(OH)–R¹ + $NaIO_4$ → R–CH₂–CHO + H_2N–Protein → R–CH₂–C(=O)–NH–Protein	[32]

-OH	氰脲酰氯反应法		[33]
	N,N-二琥珀酰亚胺基碳酸酯反应法		[34]
	N,N-羰基二咪唑反应法		[35]
	Linker 法		[35]
	多酸酐反应法		[36]
	卤代硝基苯反应法		[37]
-COOH	偶氮苯甲酸法		[38]
	碳二亚胺反应法		[39]
	混合酸酐反应法		[40]
	N,N-羰基二咪唑反应法		[41]

	活泼酯反应法	R—C(=O)—OH + HO—N(琥珀酰亚胺) →(DCC) R—C(=O)—O—N(琥珀酰亚胺) + H_2N—Protein → R—C(=O)—NH—Protein	[42]
-NH_2	戊二醛反应法	R—NH_2 + HC(=O)—CH_2—CH_2—CH_2—CH(=O) + H_2N—Protein → R—N=HC—CH_2—CH_2—CH_2—CH=N—Protein	[5]
	碳二亚胺反应法	R—NH_2 + HOOC—Protein →(EDC) R—NH—C(=O)—Protein	[43]
	异氰酸反应法	R^1—N=C=OH + R^2—NH_2 + H_2N—Protein → R^2—NH—C(=O)—NH—Protein	[44]
	N-羟基琥珀酰亚胺酯反应法	R—NH_2 + R^1—C(=O)—O—N(琥珀酰亚胺) + H_2N—Protein → R—C(=O)—NH—Protein	[45]
	重氮化反应法	R—C_6H_4—NH_2 →($NaNO_2$) R—C_6H_4—N_2^+Cl; + HO—C_6H_4—Protein → R—C_6H_4—N=N—C_6H_3(HO)—Protein	[20]
—C(=O)—	对肼基苯甲酸反应法	R(R)C=O + H_2N—NH—C_6H_4—COOH + H_2N—Protein → R(R)C=N—NH—C_6H_4—C(=O)—NH—Protein	[46]
	肟化反应法	R^1(R^2)C=O + HN(NH_2)—C_6H_4—COOH → R^1(R^2)C=N—HN—C_6H_4—COOH; + H_2N—Protein → R^1(R^2)C=N—HN—C_6H_4—C(=O)—Protein	[47]
	曼尼希反应法	R—C_6H_4—OH + $HH_2N(CH_2COOH)_2$ + HH_2CHO → R—C_6H_3(OH)—$CH_2N(CH_2COOH)_2$; + H_2N—Protein → R—C_6H_3(OH)—C(H_2N)(CH_2COOH)(CH_2CONH-Protein)	[48]
-SH	马来酰亚胺基反应法	马来酰亚胺—N—$(CH_2)_3$—COO—N(琥珀酰亚胺) + R—NH_2 + SH—Protein → R—C(=O)—NH—$(CH_2)_3$—N(琥珀酰亚胺)—S—Protein	[49]
	双马来酰亚胺基反应法	双马来酰亚胺基苯 + R—SH → R—S—(琥珀酰亚胺)N—C_6H_4—N(马来酰亚胺); + HS—Protein → R—S—(琥珀酰亚胺)N—C_6H_4—N(琥珀酰亚胺)—S—Protein	[50]

-$COOCH_3$	叠氮化反应法	R–C(=O)–O–CH₃ + Et₂Al–N=N⁺=N⁻ → R–C(=O)–N=N⁺=N⁻ + H₂N—Protein → R–C(=O)–NH–Protein	[51]

目前绝大多数人工抗原的制备均是一种载体蛋白偶联一种半抗原，其制备出的抗体特异性高，但对于同母体衍生物的检测，如抗生素来说则是一种局限。Sai 等[52]在研究牛奶中青霉素类和四环素类药物含量检测时，依次将阿莫西林和金霉素与 BSA 偶联制备新的双半抗原免疫原。获得的抗体同时与六种青霉素类药物（阿莫西林、青霉素 G、氨苄青霉素、青霉素 V、羧苄青霉素和磺苄青霉素）和四种四环素类药物（四环素、土霉素、强力霉素和金霉素）交叉反应，交叉反应性范围在 24-100%。酶联免疫吸附试验显示，抗体可同时检测牛奶中的 10 种药物且检测限在 0.4-0.37ng / mL 范围内。这项研究为小分子的免疫分析开辟了新的思路。

4. 人工抗原的纯化及鉴定

人工抗原被成功合成后需对其进行纯化，以提高机体免疫系统的识别能力，产生特异性抗体，同时减少杂质抗体。现已报道的纯化方法有透析法、离心法、凝胶层析法、离子交换层析法、柱层析法、盐析法等。目前常用的纯化方法是透析法和凝胶层析法。透析法纯化时间较长，但纯化效果好，且操作简单。凝胶层析法纯化时间较短，但操作复杂，并且需要对组分进行跟踪分析，以确定目标产物。为确定半抗原与载体是否成功偶联，需要对偶联后的产物进行鉴定。目前报道的鉴定方法有核磁共振法、红外光谱法、紫外光谱法、荧光光谱法、圆二色光谱法、凝胶-高效液相色谱法、原子力显微观察法、元素示踪法、元素分析法、聚丙烯酰胺凝胶电泳法、ESI-MS 分析法、MALDI-TOF-MS 分析法、考马斯亮蓝法等。其中核磁共振法、紫外光谱法和红外光谱法最为常用。

5. 总结与展望

具有良好免疫原性的人工抗原是免疫分析成败的关键。对于人工抗原的设计合成、分离鉴定的方法，目前国内外已有很多例子供我们借鉴。但由于小分子化合物结构的多样性以及免疫应答的复杂性，对于一个具体的待测小分子化合物，其连接臂的连接位点、连接臂的长度、载体的种类、与载体的连接方法以及偶联比等因素，均需设计、组合出多套方案，并通过免疫活性测试，优化筛选出最佳条件。这个过程往往花费大量的人力、物力且实验结果存在一定的偶然性。因此，利用计算机辅助、分子模拟以及网络数据库分析等技术手段，对半抗原分子结构进行设计、模拟，并预测半抗原分子结构与潜在免疫特性的关系，实现半抗原分子设计与抗原合成的预见性，成为该领域未来的重要发展方向。

参考文献：

[1] 李斌, 俞思明, 胡睿, 等. 呋喃西林代谢物半抗原的制备及其免疫检测中的应用. 现代食品科技, 2018, 34(03): 90-94+100.

Li B, Yu S M, Hu R, et al. Preparation of Nitrofurazone Metabolite Hapten and Its Applications in Immunoassay. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(03): 90-94+100.

[2] Lim Jongguk, Kim Giyoung, Mo Changyeun, et al. Detection of melamine in milk powders using near-infrared hyperspectral imaging combined with regression coefficient of partial least square regression model. Talanta, 2016, (151), 183-191.

[3] 王东方, 刘爽, 付骋宇, 等. 拟除虫菊酯类农药通用人工抗原合成及免疫原性鉴定. 农药, 2015, 54(07): 480-484.

Wang D F, Liu S, Fu C Y, et al. Synthesis of Generic Antigen and Identification of Its Immune Activity for Pyrethroid Insecticides. Agrochemicals, 2015, (07): 480-484.

[4] 陈荫楠, 陈华, 石贤爱, 等. 抗呋喃唑酮单克隆抗体的制备及其应用. 食品科学, 2016, 37(03): 157-163.

Chen Y N, Chen H, Shi X A, et al. Preparation and Application of Monoclonal Antibody against Furazolidone. Food Science, 2016, (03): 157-163.

[5] 李静宇, 何小维, 李敏, 等. 呋喃唑酮代谢物人工抗原的制备及鉴定. 现代食品科技, 2014, 30(10): 182-186+273.

Li J Y, He X W, Li M, et al. Preparation and Identification of Artificial Antigen of Furazolidone Metabolite. Modern Food Science and Technology, 2014, (10): 182-186+273.

[6] 刘媛媛, 陈奇娜, 徐光辉, 等. 邻苯二甲酸酯类半抗原的设计合成与抗原制备. 精细化工, 2018, 35(03): 534-540.

Liu Y Y, Chen Q N,Xu G H, et al. Design and Synthesis of Phthalate Ester Haptens and Antigens. Fine Chemicals, 2018, 35(03): 534-540.

[7] Feng H Y, Zhou L P, Shi L, et al. Development of enzyme- linked immunosorbent assay for determination of polybrominated diphenyl ether BDE- 121. Analytical Biochemistry, 2014, (447), 49-54.

[8] 邵越水, 徐建, 王镇, 一种卡西酮人工半抗原、人工抗原及其制备方法和应用: 中国, ZL201711287795. 9, 2018-05-18.

Shao Y S, Xu J, Wang Z. Preparation and application of cathinone artificial hapten and artificial antigen in detection of cathinone: Chinese, ZL201711287795. 9, 2018-05-18.

[9] 郝青，一种双酯型乌头碱完全抗原的制备方法: 中国, ZL201611162616.4. 2017-02-15.

Hao Q. Preparation of diester aconitine complete antigen for industrial production and quantitative immunoassay

of aconitine content in chinese herbal medicine：Chinese, ZL201611162616.4. 2017-02-15.

[10] 陈殿君, 李晓松, 赵辉, 等. 半抗原 DNP 修饰自体肿瘤疫苗治疗晚期恶性黑色素瘤的临床研究. 中国癌症防治杂志, 2014,6 (3): 247-252.

Chen D J, Li X S, Zhao H, et al. Clinical study of dinitrophenyl-modified autologous tumor vaccine to treat advanced malignant melanoma. Chin J Oncol Prev Treat, 2014, 6(03): 247-252.

[11] 李开春, 袁振刚, 戴兆云. 半抗原 2,4-二硝基氟苯体内外抑制肝细胞癌的初步研究. 中国肿瘤, 2013, 22(01): 63-66.

Li K C, Yuan Z G, Dai Z Y. Preliminary study of inhibitory effects of hapten 2,4-dinitrofluorobenzene on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. Zhongguo Zhongliu, 2013, 22(01), 63-66.

[12] Kee J M, Oslund R C, Couvillon A D, et al. A Second-Generation Phosphohistidine Analog for Production of Phosphohistidine Antibodies. Organic Letters, 2015, 17(2): 187-189.

[13] Kee J M, Oslund R C, Perlman D H. A pan- specific antibody for direct detection of protein histidine phosphorylation. Nature Chemical Biology, 2013, 9(7): 416-421.

[14] Kim Y J, Cho Y A, Lee H S, et al. Investigation of the effect of hapten heterology on immunoassay sensitivity and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the organophosphorus insecticide fenthion. Anal ytica Chimica Acta, 2003, 494(1-2): 29-40.

[15] Goodrow M H, Hammock B D. Hapten design for compound- selective antibodies: ELISA for environmentally- deleterious small molecules. Analytica Chimica Acta, 1998, 376(1): 83-91.

[16] 贾敏. 一种雌酚类半抗原、完全抗原及其制备方法: 中国, ZL201711063768.3. 2018-02-16.

Jia M. Estrol hapten, complete antigen and preparation method: Chinese, ZL201711063768.3. 2018-02-16.

[17] Freia J, Gee S J, Harrison R O, et al. Use of Immunochemical Techniques for the Analysis of Pesticides, Pest Management Science, 2010, 26(3): 303-317.

[18] 施海燕, 王鸣华. 半抗原的间隔臂长度对免疫识别的影响. 农药学学报, 2008,10(02): 172-177.

Shi, H Y, Wang, M H. Effect of hapten space arm length on immune recognition. Nongyaoxue Xuebao, 2008, 10(2), 172-177.

[19] Kim Y J, Cho Y A, Lee H S, et al. Synthesis of haptens for immunoassay of organophosphorus pesticides and effect of heterology in hapten spacer arm length on immunoassay sensitivity. Analytica Chimica Acta, 2003, 475(1-2): 85-96.

[20] Manclus J J, Abad A, Lebedev M Y, et al. Development of a monoclonal immunoassay selective for chlorinated cyclodiene insecticides. Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(10): 2776-2784.

[21] 赖丹, 郑盛武, 赵肃清. 4 种邻苯二甲酸酯塑化剂人工抗原的合成及免疫检测. 食品科学, 2016, 37(05):

114-120.

Lai D, Zheng S E, Zhao S Q. Synthesis of Artificial Antigens for Immunoassay of Four Phthalate Esters. Food Science, 2016, 37(05): 114-120.

[22] 王倩, 徐霞, 富国芬, 等. 一种去甲替林人工抗原的制备方法: 中国, ZL201510607771.1. 2017-03-29.

Wang Q, Xu X, Fu G F, et al. Method for preparing artificial antigen of nortriptyline: Chinese, ZL201510607771. 1. 2017-03-29.

[23] Li L H; Xu Z L,Sun Y M,et al. Synthesis and characterization of AOZ hapten and artificial antigens. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(02): 49-51+76.

[24] Ravindra D D, Noor A, Ankit S, et al. Development and evaluation of folate functionalized albumin nanoparticles for targeted delivery of gemcitabine. International Journal of Pharmaceutics, 2015, 07(012): 80-91.

[25] 姜震, 纪明山, 李兴海, 等. 苯胺嘧啶类杀菌剂嘧霉胺人工抗原的合成与鉴定. 农药, 2018, 57(01): 9-11.

Jiang Z, Ji M S, Li X H. Synthesis and Identification of Pyrimethanil Artificial Antigen of Aniline Pyrimidine Fungicide. Agrochemicals, 2018, 57(01): 9-11.

[26] Zhang Z, Zhu N F, Huang M L, et al. Sensitive immunoassay for simultaneous determination of tetrabromobisphenol A bis(2- hydroxyethyl) ether and tetrabromobisphenol A mono(hydroxyethyl) ether: An effective and reliable strategy to estimate the typical tetrabromobisphenol A derivative and byproduct in aquatic environments. Environmental Pollution (Oxford, United Kingdom), 2017, (229), 431-438.

[27] S Hatanaka, I Imamura, Y Terazawa, et al. The characteristics of specific IgG to phthalic anhydride (PA)-albumin conjugate. Industrial Health, 1997, 35(4): 508-514.

[28] Wang J, Bever C S, Majkova Z, et al. Heterologous Antigen Selection of Camelid Heavy ChainSingle Domain Antibodies against Tetrabromobisphenol A. Analytical Chemistry, 2014, 86(16): 8296-8302.

[29] KD Janda. Heroin haptens, immunoconjugates and related uses: US. Patent, 20150343054. 2015-07-21.

[30] 宁波, 李隆军, 刘明如, 等. 克拉霉素半抗原、人工抗原和抗体及其制备方法应用: 中国, ZL201611125939. 6. 2017-04-26.

Ning B, Li L J, Liu M R, et al. Preparation of clarithromycin artificial antigen to produce antibodies for detection of residual macrolide antibiotic in honey: Chinese, ZL201611125939. 6. 2017-04-26.

[31] Corine A.N. Broekhuizen, Leonie de Boer, Kim Schipper, et al. The influence of antibodies on Staphylococcus epidermidis adherence to polyvinylpyrrolidone- coated silicone elastomer in experimental biomaterial-associated infection in mice. Biomaterials, 2009, 30(32): 6444-6450.

[32]Ravindra Dhar Dubey, Noor Alam, Ankit Saneja, et al. Development and evaluation of folate functionalized

albumin nanoparticles for targeted delivery of gemcitabine. International Journal of Pharmaceutics, 2015, 07(012): 80-91.

[33] Jiang Z H, Zhang J H. Biomolecular immobilization techniques and their applications. Activition Methods of Sulfhydryl Group, 1998, 60-67.

[34] Mercader J V, Esteve FA, Agullo C, et al. Antibody generation and immunoassay development in diverse formats for pyrimethanil specific and sensitive analysis. Analyst, 2012, 137(23): 5672-5679.

[35] 郑伟. 莱克多巴胺人工抗原的制备及鉴定. 郑州:郑州大学, 2014.

Zheng W. Production and Identifcanon of Ractopamine Artificial Antigen. Zhengzhou:Zhengzhou University, 2014.

[36] 贾爱娟，刘姚，张挺，等.基于 3 种载体蛋白的莱克多巴胺抗原的合成与检测. 广东农业科学, 2017, 44(07): 125-131.

Jia A J, Liu T, Zhang T, et al. Synthesis and testing the ractopamine antigens conjugating with three different carrier proteins. Guangdong Agricultural Sciences, 2017, 44(07): 125-131.

[37] 尹静梅，张瑞，贾颖萍，等. 芳香硝基化合物还原制备芳胺的研究进展. 化学研究, 2010, 21(01): 96-101.

Yin J M, Zhang R, Jia Y P, et al. Research Progress in Preparation of Aromatic Amine via Reduction of Aromatic Nitro Compounds. Chemical Research, 2010, 21(01): 96-101.

[38] Han D, Yu M, Knopp D, et al. Development of a highly sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Sudan I in food samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(16): 6424-6430.

[39] 徐振林，罗林，孙远明，等. 一种呫吨聚氨基甲酸乙酯半抗原、人工抗原及其应用：中国, ZL201610675358.3. 2017-01-11.

Xu Z L, Luo L, Sun Y M, et al. Xanthene poly(ethyl carbamate) hapten, artificial antigen and application thereof: Chinese, ZL201610675358.3. 2017-01-11.

[40] 姜震，纪明山，李兴海，等. 苯胺嘧啶类杀菌剂嘧霉胺人工抗原的合成与鉴定. 农药, 2018, 57(01): 9-11.

Jiang Z, Ji M S, Li X H. Synthesis and Identification of Pyrimethanil Artificial Antigen of Aniline Pyrimidine Fungicide. Agrochemicals, 2018, 57(01): 9-11.

[41] Kamiński K, Rapacz A, Luszczki JJ, et al. Design, synthesis and biological evaluation of new hybrid anticonvulsants derived from N-benzyl-2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)propanamide and 2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)butanamide derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2015, 23(10):

2548-2561.

[42] Wang L, Shao H F, et al. Synthesis and Analysis of Benzo(a)pyrene Artificial Antigen. Food Science, 2014, 35(19): 53-56.

[43] Kriechbaum M, List M, Himmelsbach M, et al. Peptide Coupling between Amino Acids and the Carboxylic Acid of a Functionalized Chlorido-gold(I)-phosphane. Inorganic Chemistry, 2014, 53(19): 10602-10610.

[44] Grange R L, Evans P A. Metal-Free Metathesis Reaction of C-Chiral Allylic Sulfilimines with Aryl Isocyanates: Construction of Chiral Nonracemic Allylic Isocyanates. Cheminform, 2014, 136(34): 11870-11873.

[45] 叶肖俊.一种苯胺绿人工抗原的制备方法: 中国, ZL201610594859. 9. 2016-10-26.

YE, X J. Preparation method of aniline green artificial antigen: Chinese, ZL201610594859. 9. 2016-10-26.

[46] Ravindra Dhar Dubey, Noor Alam, Ankit Saneja, et al. Development and evaluation of folate functionalized albumin nanoparticles for targeted delivery of gemcitabine. International Journal of Pharmaceutics, 2015, 07(012): 80-91.

[47] 陈宇熹, 方振霞, 雷美玲, 等. 黄曲霉毒素 B_1 人工抗原的制备、鉴定与免疫特性研究. 武夷科学, 2017, 33(00): 80-87.

Chen Y X, Fang Z L, Lei M L, et al. Wuyi. Preparation and identification and immunological properties of Aflatoxin B_1 artificial antigen. Wuyi Science Journal, 2017, 33(00): 80-87.

[48] Gao Y, Yang M, Peng C, et al. Preparation of highly specific anti-zearalenone antibodies by using the cationic protein conjugate and development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay. Analyst, 2012, 137(1): 229-236.

[49] 陆俭, 李萍, 马亚茹, 等. 恶性疟原虫环子孢子蛋白四肽重复序列单克隆抗体的制备. 中国生物制品学杂志, 2015, 28(10): 1039-1043.

Lu J, Li P, Ma Y R, et al. Preparation of monoclonal antibody against tetrapeptide repeated motif of malignant Plasmodium falciparum circumsporozoite protein. Chinese Journal of Biologicals, 2015, 28(10): 1039-1043.

[50] Desilva B S, Wilson G S. Synthesis of bifunctional antibodies for immunoassays. Methods, 2000, 22(1): 33-43.

[51] 王倩倩, 杨功俊. 抗呋喃唑酮代谢物单克隆抗体的制备. 中国家禽, 2016, 38(24): 63-65.

Wang Q Q, Yang G J. Preparation of monoclonal antibodies against furazolidone metabolites. China Poultry, 2016, 38(24): 63-65.

[52] Sai N J, Jing L, Yi F Z, et al. Preparation of a bi-hapten antigen and the broad-specific antibody for simultaneous immunoassay of penicillins and tetracyclines in milk. Food and Agricultural Immunology, 2012 , 23 (3) :273-287.